苏氨酸对大鼠小肠上皮细胞系 IEC-6 细胞活性和紧密连接蛋白表达的影响

任　曼　黄金歌　靳二辉　车传燕　胡倩倩　周金星　李升和*

（安徽科技学院动物科学学院，凤阳 233100）

摘　要：本研究旨在探讨苏氨酸对大鼠小肠上皮细胞活性和增殖的影响，并研究苏氨酸是否对大鼠小肠上皮细胞紧密连接蛋白表达具有调控作用。试验采用不同浓度的苏氨酸（0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mmol/L）处理大鼠小肠上皮细胞系 IEC-6 细胞 24 h，用噻唑兰（MTT）法测定 IEC-6 细胞活性，伊红-美蓝（HE）染色观察 IEC-6 细胞增殖情况，Western-blot 法检测 IEC-6 细胞紧密连接蛋白表达情况。结果表明：各浓度的苏氨酸均能不同程度地提高 IEC-6 细胞的活性，0.5 mmol/L 苏氨酸处理 24 h 时 IEC-6 细胞的活性最高，且与未经苏氨酸处理的对照组差异显著（P<0.05）。不同浓度的苏氨酸均能促进 IEC-6 细胞的增殖，且在苏氨酸浓度为 0.5 mmol/L 时促增殖作用最明显。与未经苏氨酸处理的对照组，0.1 mmol/L 的苏氨酸对紧密连接蛋白 claudin-3 的表达未产生显著影响（P>0.05），但显著促进了 occludin 的表达（P<0.05）；苏氨酸浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0 mmol/L 时均显著促进上述 2 种紧密连接蛋白的表达（P<0.05），使 claudin-3 的相对表达量分别增加了 1.84、7.08、8.71、3.83 倍，occludin 的相对表达量分别增加了 2.65、2.71、2.82、3.88 倍。综上，适宜浓度的苏氨酸对大鼠小肠上皮细胞系 IEC-6 细胞的活性和增殖具有促进作用，且在浓度为 0.5 mmol/L 时作用最显著，同时促进了紧密连接蛋白 claudin-3 和 occludin 的表达。

关键词：苏氨酸；IEC-6 细胞；活性；增殖；紧密连接蛋白

中图分类号：S816　　文献标识码：A　　文章编号：

幼龄动物肠道功能发育尚未完善，肠道健康对幼龄动物的生长发育至关重要，直接影响动物的生产性能和经济效益，鉴于抗生素滥用问题的多发，通过营养调控手段提高幼畜肠道功能具有切实的意义。苏氨酸不仅用于机体蛋白质合成，还参与机体其他生理功能如免疫等[1-2]，哺乳动物从食物中摄取的苏氨酸有 60%～80%被用于门静脉排流组织（partal-drained viscera,PDV）代谢[1]。近年的研究发现，苏氨酸对幼龄动物肠道黏膜免疫功能和消化功能具有一定的作用，苏氨酸缺乏会降低肠道消化酶活性，增加黏膜通透性并，降低肠道黏膜蛋白合成，进而直接影响机体健康[3-5]；适宜浓度的苏氨酸可增强肠道黏膜屏障功能，促进肠道内免疫球蛋白 A(IgA)分泌并提高消化酶活性[6-7]。有关苏氨酸的研究多集中在动物体内试验，苏氨酸对肠道功能调节作用的机制研究缺乏，尤其是在细胞水平的研究。肠道上皮细胞培养基中的苏氨酸浓度一般为 0.449 mmol/L (0.053 45 g/L)，本试验以此为基础设计了苏氨酸的添加浓度。前人研究表明，来源于大鼠空肠隐窝上皮的非转化细胞株 IEC-6 细胞与正常的小肠

收稿日期：2018-03-16

基金项目：国家自然科学基金（31501968）；安徽省自然科学基金（1608085QC72）；安徽省高校自然科学研究项目（KJ2015A296）

作者简介：任　曼（1986-），女，安徽淮北人，副教授，从事仔猪肠道健康和氨基酸营养相关研究。E-mail：renman@yeah.net

*通信作者：李升和，教授，硕士生导师，E-mail：　lish@ahstu.edu.cn

隐窝细胞具有相同的形态学特征、生长特性、合成细胞外基质的能力以及细胞专一性的质膜抗原[8]。IEC-6 细胞存活力强，增殖速度快，易保存和培养，很适合用于肠道功能相关的试验研究。本研究以大鼠小肠上皮细胞系 IEC-6 细胞为对象，通过分析不同浓度苏氨酸对 IEC-6 细胞活性、增殖和紧密连接蛋白表达的影响，研究苏氨酸在不同浓度下对小肠上皮细胞的作用，初步探究苏氨酸对肠道屏障功能的可能作用机制，为苏氨酸在动物生产的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1. 1 试验材料

大鼠小肠上皮细胞系 IEC-6 细胞（中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心）、苏氨酸（99.9%，Sigma，美国）、高糖 DMEM 培养基(HyClone，美国)、胎牛血清（FBS）（Gibco，美国）、胰岛素（注射用）、胰蛋白酶（Gibco，美国）、噻唑兰（MTT）（Amresco，美国）、二甲基亚砜（DMSO）、伊红（国药集团化学试剂有限公司）、苏木精（国药集团化学试剂有限公司）、FSHR 兔多克隆抗体（Abcam，英国）、山羊抗兔 lg(H+L)抗体（拜力生物科技有限公司）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）、Western-blot 试剂（10×）（上海碧云天生物技术有限公司）、化学发光显影定影试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）。

1.2 细胞培养和测定

1.2.1 IEC-6 细胞培养

冻存的 IEC-6 细胞迅速在 37 ℃水浴锅中溶解，转入离心管，加入含 10%FBS、0.01 mg/mL 胰岛素的高糖 DMEM 培养基，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清液，用高糖 DMEM 培养基混匀细胞，转入培养皿，置于 5%CO_2 37 ℃培养箱中培养。

1.2.2 MTT 法检测 IEC-6 细胞活性

96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液，每孔含 10^4 个细胞[边缘孔用无菌磷酸盐缓冲液（PBS）填充]，5%CO_2 37 ℃孵育 24 h。小心吸去培养液，每孔加入 100 μL 苏氨酸处理液，苏氨酸处理液中苏氨酸浓度分别设定为 0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mmol/L，每个浓度设置 4～6 个重复，同时设置调零孔和对照孔，5%CO_2 37 ℃孵育 24 h。每孔再加入 20 μL 终浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液，继续培养 4 h。小心吸去培养液，每孔加入 150 μL DMSO，于酶联免疫检测仪低速振荡 10 min，在 490 nm 处测量各孔的吸光度（OD）值。

1.2.3 苏木精-伊红（HE）染色观察 IEC-6 细胞增殖情况

将细胞接种于 6 孔板内，底部铺上细胞爬片，待细胞生长愈合至 80%时，加入不同浓度（0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mmol/L）的苏氨酸处理液，处理 24 h 后进行 HE 染色。用 PBS 洗涤 2～3 次，晾干，甲醇固定 5～8 min，PBS 再洗 2～3 次，蒸馏水冲洗 1 遍，玻片甩干，苏木精染色 5 min，自来水冲洗干净，1% $NaHCO_3$ 洗至蓝色，玻片晾干，伊红染色 5 min，无水乙醇冲洗干净后，无水乙醇洗 2 次，每次 1～2 min，醇苯洗 2 次，每次 1～2 min，最后用二甲苯洗 5～10 min，玻片自然晾干，中性树胶封片。显微镜下观察细胞形态和生长情况。

1.2.4 Western blot 法检测 IEC-6 细胞紧密连接蛋白表达情况

蛋白样品的准备：细胞接种于 6 孔板，每孔 3 mL 培养基，待细胞生长融合至 80%~90%，吸去培养基，PBS 洗 3 遍，每孔加入 2 mL 无氨基酸培养基，处理 2 h。吸去培养基，加入 2 mL 不同浓度（0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mmol/L）的苏氨酸处理液处理 24 h。弃去处理液，每孔加入 60 μL 蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物，10 min 后收集细胞，蛋白质抽提试剂盒提取细胞蛋白，BCA 蛋白浓度测定试盒测定蛋白浓度。按照 5×上样缓冲液制备蛋白样品。配制十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶，每孔上样 30 μg 蛋白样品，在 90 V 恒压下电泳至分离胶，然后再在 120 V 恒压下电泳至溴酚蓝刚跑出分离胶底部。电泳完毕后，聚偏氟乙烯（PVDF）膜转膜，封闭和抗体孵育，将 PVDF 膜放入 AlphaImager 2200（Alpha Innotech，美国）系统中进行曝光、摄像。

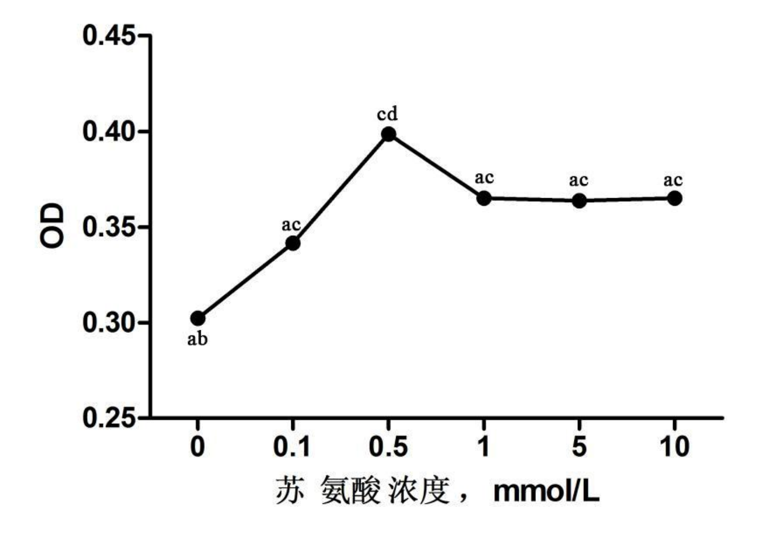
1.3 数据分析与处理

试验数据用 SAS 9.4 软件中的单因素方差分析进行分析，$P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同浓度苏氨酸对 IEC-6 细胞活性的影响

如图 1 所示，经不同浓度的苏氨酸处理后，IEC-6 细胞活性均有不同程度的提高，苏氨酸浓度为 0.5 mmol/L 时 IEC-6 细胞的活性最高，且与未经苏氨酸处理的对照组差异显著（$P<0.05$），但超过这个浓度后 IEC-6 细胞的活性开始下降，在数值上仍高于未经苏氨酸处理的 IEC-6 细胞，但差异不显著（$P>0.05$），说明适宜浓度的苏氨酸可提高大鼠小肠上皮细胞的活性。



数据点标注不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），相同字母表示差异不显著（$P<0.05$）。

Data points with different small letters mean significant difference ($P<0.05$), while with the same letters mean no significant difference ($P>0.05$).

图 1 不同浓度苏氨酸对 IEC-6 细胞活性的影响

Fig.1 Effects of threonine with different concentrations on IEC-6 cell activity

2.2 不同浓度苏氨酸对 IEC-6 细胞增殖的影响

不同浓度苏氨酸处理 IEC-6 细胞 24 h 之后细胞形态和增殖情况如图 2 所示。在空间和营养充足情况下，IEC-6 细胞贴壁生长，形态上呈长椭圆形、梭形，细胞核呈圆形或卵圆形且位于细胞中央。与未经苏氨酸处理的对照组相比，不同浓度的苏氨酸均能促进 IEC-6 细胞的增殖，且在苏氨酸浓度为 0.5～1.0 mmol/L 时促增殖作用最明显，再增加苏氨酸浓度，则细胞浓度降低，但仍大于对照组，此结果与 MTT 法检测的细胞活性结果一致。

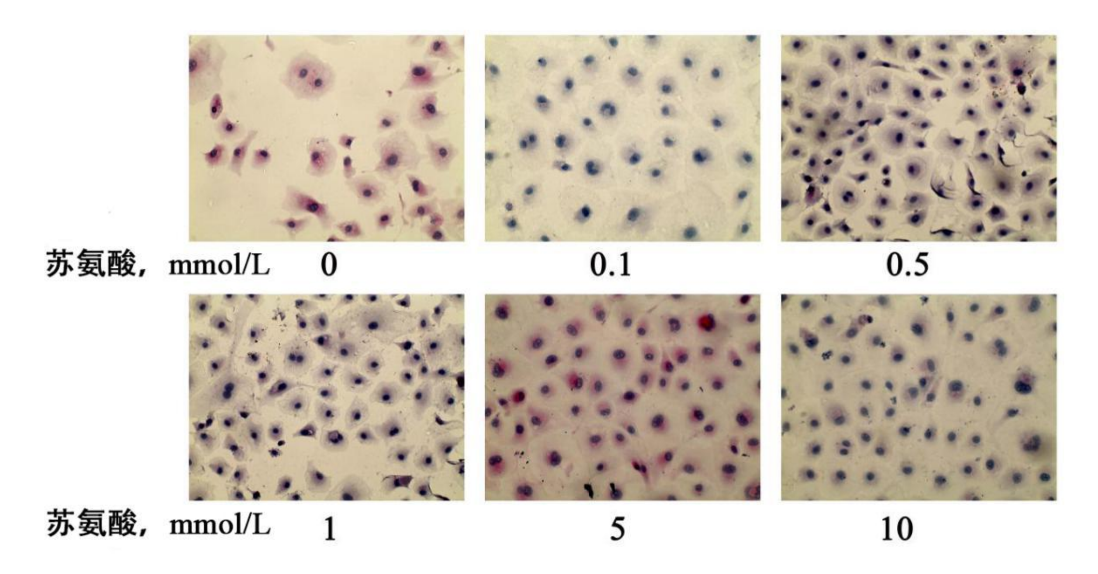
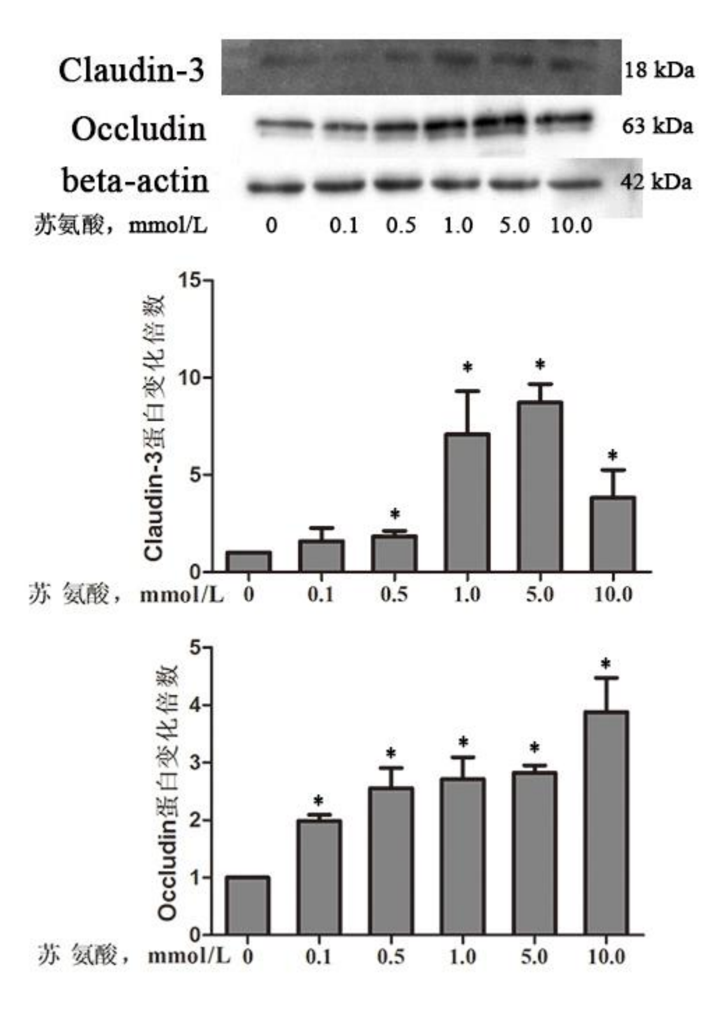


图 2　不同浓度苏氨酸对 IEC-6 细胞增殖的影响（HE 染色，200×）

Fig.2　Effects of threonine with different concentrations on IEC-6 cell proliferation (HE staining, 200×)

2.3 不同浓度苏氨酸对 IEC-6 细胞紧密连接蛋白表达的影响

以内参β-actin 为参照，图 3 所示为不同浓度苏氨酸对 IEC-6 细胞紧密连接蛋白表达的影响。分析结果表明，与未经苏氨酸处理的对照组相比，0.1 mmol/L 的苏氨酸对紧密连接蛋白 claudin-3 的表达没有产生显著影响（$P>0.05$），但显著促进了 occludin 的表达（$P<0.05$）；苏氨酸浓度为 0.5、1.0、5.0、10.0 mmol/L 时均显著促进上述 2 种紧密连接蛋白的表达（$P<0.05$），其中 claudin-3 的相对表达量分别增加了 1.84、7.08、8.71、3.83 倍，occludin 的相对表达量分别增加了 2.65、2.71、2.82、3.88 倍，以苏氨酸浓度为 5.0 mmol/L 时 claudin-3 的相对表达量最高，以苏氨酸浓度为 10.0 mmol/L 时 occludin 的相对表达量最高。



"*"表示与未经苏氨酸处理的对照组相比差异显著（*P*<0.05）。

"*" mean significant difference compared with control group which treated without threonine.

图 3　不同浓度苏氨酸对 IEC-6 细胞紧密连接蛋白 occludin 和 claudin-3 表达的影响

Fig.3　Effects of threonine with different concentrations on expression of tight junction proteins occludin and claudin-3 of IEC-6 cell

3 讨　论

目前，苏氨酸已在畜牧养殖、食品和医药等行业中广泛应用，其在维持畜禽正常的生长发育和免疫功能中发挥着重要的作用。适量苏氨酸可以平衡饲粮中氨基酸组成，降低饲粮蛋白质水平，并通过调节肠道内细胞因子表达[9]和肠道黏膜蛋白合成[10]等机制提高幼龄动物肠道屏障功能，增强对病原微生物的抵御作用，提高免疫力和抗病能力[11]。哺乳动物肠道不仅是机体消化吸收营养物质的首要部位，还是阻挡有害病原和病原菌入侵的首要屏障，对动物

机体的生长发育起到重要作用[12]。肠道黏膜黏液含量、形态学状况、上皮细胞通透性、刷状缘酶活性等决定着肠道黏膜的完整性，其中肠道黏膜上皮细胞及其之间的连接共同构成了肠道的机械屏障，直接决定着肠道功能是否正常[3]。小肠隐窝上皮细胞在肠道细胞中是一种重要的功能性细胞，肠道黏膜损伤后主要依靠隐窝上皮细胞的不断增殖、分化来完成修复，以重建肠道的屏障功能[13]。研究发现，饲粮中标准回肠可消化苏氨酸水平为 7.5～11.1 g/kg 时可显著提高断奶仔猪肠道屏障功能并降低大肠杆菌感染率[11]；在猪空肠上皮细胞培养中，53.45、106.90、160.35 mg/L 的苏氨酸均可不同程度地提高细胞先天性免疫功能，并可上调白细胞介素-6（*IL*-6）和白细胞介素-5（*IL*-5）的表达[9]。本研究结果发现，适宜浓度的苏氨酸可提高大鼠小肠上皮细胞系 IEC-6 细胞的活性，增加其紧密连接蛋白的表达，从而提高小肠的机械屏障功能，促进肠道健康，与前人研究结果一致。其中，0.5 mmol/L 苏氨酸对 IEC-6 细胞活性和增殖的促进作用最显著，5.0 和 10.0 mmol/L 苏氨酸对 occludin 和 claudin 表达的促进作用最显著。细胞的增殖和活性需要多种营养素和生长因子的功能调控，而紧密连接蛋白的合成除了受基因调控外还有氨基酸底物的影响，底物浓度越高蛋白质合成速度越快，所以出现了本试验中的最适浓度差异。但当单一氨基酸浓度过高时会影响其他氨基酸的转运，进而降低蛋白质的合成，本试验结果表明，苏氨酸浓度达到 10.0 mmo/L 时并未造成其他氨基酸的转运拮抗。由于本试验中设计的苏氨酸浓度范围较大，需要缩窄浓度范围深入探究苏氨酸对小肠上皮细胞活性、增殖和紧密连接蛋白表达的最适浓度范围。紧密连接是上皮细胞之间的重要连接体，与肠道营养物质的吸收和微生物的黏附关系密切，参与多种信号通路，调控细胞增殖、分化等[14]。occludin 是第 1 个被确认的紧密连接特异性跨膜蛋白，是上皮细胞紧密连接中主要表达的蛋白，其在细胞旁渗透性的调控中起着非常重要的作用[15]。claudin 家族被认为是紧密连接蛋白的“脊梁”，其可调控肠道上皮的屏障功能[16]，occludin 与 claudin 直接或间接地相互作用。本研究中，不同浓度的苏氨酸可不同程度地促进小肠上皮细胞中 occludin 与 claudin 的表达，说明苏氨酸对肠道的通透性和屏障功能均具有调节作用，也证实了前人动物体内试验的结果[6-7]。国内外研究中有关苏氨酸对细胞活性和增殖影响的研究较为缺乏，已有研究发现，多种功能性氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸、精氨酸等可提高小肠上皮细胞的增殖并增加肠道屏障功能[17-19]。亮氨酸、异亮氨酸、精氨酸和苏氨酸均可为肠道供能并参与多种肠道蛋白质的合成，其中大部分苏氨酸（71%）作为合成黏膜上皮细胞蛋白和分泌蛋白的底物，少部分（2%～9%）苏氨酸氧化为肠道上皮细胞供能[1]。结合本试验结果，苏氨酸可能是通过保证肠道上皮细胞的能量供给和为细胞活性和增殖所需的蛋白提供了底物，进而提高了细胞活性，促进了细胞增殖和紧密连接蛋白的表达。

4 结　论

综上，适宜浓度的苏氨酸对大鼠小肠上皮细胞系 IEC-6 细胞的活性和增殖具有促进作用，且在浓度为 0.5 mmol/L 时作用最显著，并同时促进了紧密连接蛋白 claudin-3 和 occludin 的表达。

参考文献：

[1] SCHAART M W,SCHIERBEEK H,VAN DER SCHOOR R D,et al.Threonine utilization is high in the intestine of piglets[J].The Journal of Nutrition,2005,135(4):765–770.

[2] LI P,YIN Y L,LI D F,et al.Amino acids and immune function[J].British Journal of Nutrition,2007,98(2):237–252.

[3] MAO X,ZENG X,QIAO S,et al.Specific roles of threonine in intestinal mucosal integrity and barrier function[J].Frontiers in Bioscience,2011,3:1192–1200.

[4] FAURE M,MOËNNOZ D,MONTIGON F,et al.Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats[J].The Journal of Nutrition,2005,135(3):486–491.

[5] MUNASINGHE L L,ROBINSON J L,HARDING S V,et al.Protein synthesis in mucin-producing tissues is conserved when dietary threonine is limiting in piglets[J].The Journal of Nutrition,2017,147(2):202–210.

[6] AZZAM M M M,ZOU X T,DONG X Y,et al.Effect of supplemental L-threonine on mucin 2 gene expression and intestine mucosal immune and digestive enzymes activities of laying hens in environments with high temperature and humidity[J].Poultry Science,2011,90(10):2251–2256.

[7] TREVISI P,CORRENT E,MAZZONI M,et al.Effect of added dietary threonine on growth performance,health,immunity and gastrointestinal function of weaning pigs with differing genetic susceptibility to *Escherichia coli* infection and challenged with *E.coli* K88ac[J].Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition,2015,99(3):511–520.

[8] GÖKE M N,SCHNEIDER M,BEIL W,et al.Differential glucocorticoid effects on repair mechanisms and NF-κB activity in the intestinal epithelium[J].Regulatory Peptides,2002,105(3):203–214.

[9] 韩国全,余冰,陈代文,等.苏氨酸对体外培养感染伪狂犬病毒猪空肠上皮细胞免疫相关基因表达的影响[J].动物营养学报,2012,24(3):487–496.

[10] WANG X,QIAO S Y,YIN Y L,et al.A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young pigs[J].The Journal of Nutrition,2007,137(6):1442–1446.

[11] REN M,LIU X T,WANG X,et al.Increased levels of standardized ileal digestible threonine attenuate intestinal damage and immune responses in *Escherichia coli* $K88^+$ challenged weaned piglets[J].Animal Feed Science and Technology,2014,195:67–75.

[12] CUMMINS A G,THOMPSON F M.Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in human[J].Gut,2002,51(5):748–754.

[13] 李艳云,张艳英,史秋梅,等.紫锥菊多糖对 LPS 损伤后 IEC-6 细胞的增殖作用[J].安徽农业科学,2015,43(14):19–21,73.

[14] CHIBA H,OSANAI M,MURATA M,et al.Transmembrane proteins of tight junctions[J].Biochimcaet Biophysica Acta：Biomembranes,2008,1778(3):588–600.

[15] MITIC L,VAN TIALLIE C M,ANDERSON J M.Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions Ⅰ.Tight junction structure and function:lessons from mutant animals and proteins[J].American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,2000,279(2):G250–G254.

[16] FURUSE M,HATE M,FURUSE K,et al.Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier:a lesson from claudin-1-deficient mice[J].The Journal of Cell Biology,2002,156(6):1099–1111.

[17] ZHANG S H,REN M,ZENG X F,et al.Leucine stimulates ASCT2 amino acid transporter expression in porcine jejunal epithelial cell line (IPEC-J2) through PI3K/Akt/mTOR and ERK signaling pathways[J].Amino Acids,2014,46(12):2633–2642.

[18] REN M,ZHANG S H,LIU X T,et al.Different lipopolysaccharide branched-chain amino acids modulate porcine intestinal endogenous β-defensin expression through the Sirt1/ERK/90RSK pathway[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2016,64(17):3371–3379.

[19] XIAO H,ZENG L M,SHAO F Y,et al.The role of nitric oxide pathway in arginine transport and growth of IPEC-1 cells[J].Oncotarget,2017,8(18):29976–29983.

Effects of Threonine on Activity and Tight Junction Protein Expression of Rat Intestinal Epithelia Cell Line IEC-6 Cell

REN Man HUANG Jinge JIN Erhui CHE Chuanyan HU Qianqian ZHOU Jinxing LI Shenghe*

(*College of Animal Science, Anhui Science and Technology University, Anhui* 233100*, China*)

Abstract: This experiment was to investigate the effects of threonine on the activity and proliferation of rat intestinal epithelial cells, and to explore whether threonine had regulation effect on tight junction protein expression of rat intestinal epithelial cells. Rat intestinal epithelial cell line IEC-6 cells were treated with different concentrations （0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mmol/L） of threonine for 24 h. The IEC-6 cell activity was determined using MTT method, the IEC-6 cell proliferation was observed through hematoxylin and eosin (HE) staining, and the expression of IEC-6 cell tight junction proteins claudin-3 and occludin were tested by Western-blot method. The results showed that different concentrations of threonine could increase the IEC-6 cell activity in varying degree, and the IEC-6 cell activity was the highest after explored to 0.5 mmol/L threonine for 24 h, and it significantly higher that the control group which not treated by threonine (P<0.05). IEC-6 cell proliferation also was enhanced by different concentrations of threonine, and the 0.5 mmol/L threonine group had best effect. Compared with the control group which not treated by threonine, threonine with the concentration of 0.1 mmol/L had no effect on the tight junction protein claudin-3 expression （P>0.05）, but significantly increased the occludin expression (P<0.05). Compared with the control group which not treated by threonine, threonine with the concentrations of 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mmol/L significantly increased the occludin and claudin-3 expression, the relative expression level of claudin-3

*Corresponding author, professor, E-mail: lish@ahstu.edu.cn (责任编辑 菅景颖)

increased by 1.84, 7.08, 8.71 and 3.83 times, respectively, and the relative expression level of occluding increased by 2.65, 2.71, 2.82 and 3.88 times, respectively. In conclusion, threonine with properly concentration can improve the activity and proliferation of IEC-6, and 0.5 mmol/L threonine has the most significant effect. Meanwhile, the 0.5 mmol/L threonine up-regulates the expression of tight junction proteins claudin-3 and occludin.

Key words: threonine; IEC-6 cell; activity; proliferation; tight junction protein